

Express Mail No. EV 377 492 653 US

Inventors: Kozo TSUBOUCHI et al

Title: Extraction and Utilization of
Cell Growth-Promoting Peptides
from Silk Protein

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 2 月 2 8 日

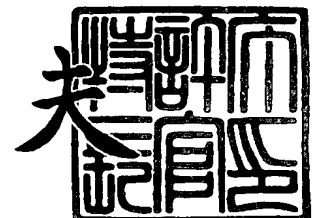
出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 0 5 5 0 4 8
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 5 5 0 4 8]

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人農業生物資源研究所
坪内 紘三

2 0 0 4 年 2 月 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 0 8 0 1 0

【書類名】 特許願

【整理番号】 PSK0301011

【提出日】 平成15年 2月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 01/00

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県筑波郡谷和原村絹の台 3 丁目 3 - 1 - 9 - 3 0 2

 【氏名】 坪内 紘三

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市館野 6 0 4 - 3

 【氏名】 山田 弘生

【特許出願人】

 【識別番号】 501167644

 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台二丁目 1 番地 2

 【氏名又は名称】 独立行政法人 農業生物資源研究所

 【代表者】 岩渕 雅樹

【特許出願人】

 【識別番号】 597094352

 【住所又は居所】 茨城県筑波郡谷和原村絹の台 3 丁目 3 - 1 - 9 - 3 0 2

 【氏名又は名称】 坪内 紘三

【代理人】

 【識別番号】 100103805

 【住所又は居所】 東京都新宿区高田馬場 1 丁目 2 9 番 2 1 号 みかどビル
5 階

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 白崎 真二

 【電話番号】 03-5291-5578

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 065021

【納付金額】 6,300円

【その他】 国等以外のすべての者の持分の割合 3 0 / 1 0 0

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 持分契約書 1

【提出物件の特記事項】 追って補充する

【包括委任状番号】 0115153

【包括委任状番号】 0117490

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 絹タンパクから細胞生育ペプチドの抽出と利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

絹タンパクを構成する非結晶部のペプチド鎖から選ばれる 1 又は 2 以上のペプチド鎖の部分ペプチドを含有してなり、該部分ペプチドはアミノ酸残基数が少なくとも 4 ～ 32 からなる特定のアミノ酸配列を有するペプチドであることを特徴とする細胞生育促進性に優れたペプチド組成物。

【請求項 2】

特定のアミノ酸配列を有するペプチド鎖が、次の (1) ～ (8) のいずれかのアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 1 に記載のペプチド組成物。

- (1) VITDSDGNE
- (2) NINDFDED
- (3) AASSVSSASSRSYDYSRRNVRKN
- (4) GSSGFGPYVAHGGYSGYEYAWSSSEDFGT
- (5) YGWGDGGYGS
- (6) DEYVDN
- (7) VETIVLEEDPYGHEDIYEED
- (8) DDGFVLDGGYDSE

【請求項 3】

次の (1) ～ (8) のいずれかのアミノ酸配列を含有することを特徴とする細胞生育促進性に優れたペプチド。

- (1) VITDSDGNE
- (2) NINDFDED
- (3) AASSVSSASSRSYDYSRRNVRKN
- (4) GSSGFGPYVAHGGYSGYEYAWSSSEDFGT
- (5) YGWGDGGYGS
- (6) DEYVDN
- (7) VETIVLEEDPYGHEDIYEED

(8) DDGFVLDGGYDSE

【請求項 4】

家蚕の未分解絹タンパク又は天蚕の未分解絹フィブロインを、加水分解した後、分子量分画により細胞生育促進性に優れたペプチドを分離、取得する方法。

【請求項 5】

加水分解を希酸、ヒドロキシルアミン又は蛋白分解酵素により行うことを特徴とする請求項 4 に記載の細胞生育促進性に優れたペプチドを分離、取得する方法。

【請求項 6】

請求項 1、2 に記載のペプチド組成物を含有する細胞増殖促進剤。

【請求項 7】

請求項 3 に記載のペプチドを含有する細胞増殖促進剤。

【請求項 8】

請求項 1、2 に記載のペプチド組成物を含有する創傷治癒促進剤。

【請求項 9】

請求項 3 に記載のペプチドを含有する創傷治癒促進剤。

【請求項 10】

請求項 1、2 に記載のペプチド組成物を含有する化粧品。

【請求項 11】

請求項 3 に記載のペプチドを含有する化粧品。

【請求項 12】

請求項 1、2 に記載のペプチド組成物を含有する細胞培養基材。

【請求項 13】

請求項 3 に記載のペプチドを含有する細胞培養基材。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、絹タンパク由来の細胞生育促進性に優れたペプチド及びその製造法、並びにそのスキンケア用素材としての医薬品、医薬部外品、化粧品等の分野

への利用及びバイオ素材として細胞培養基材への利用に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

絹糸は手術糸として古くから使われてきたことから、絹タンパクは生体適合性素材と考えられ、その特性に着目して各種分野において新しい用途の開発が、最近、盛んになされてきている。

例えば、絹糸を溶解して絹タンパク水溶液とした後に、これを凝固・乾燥・粉碎等により粉末化し、化粧用添加材として、また絹タンパク水溶液を平板上でキャスト等によりフィルム状物とし、細胞培養床や創傷被覆材およびコーティング材として、また絹タンパク水溶液をゲル状物とし、食品や化粧品として利用するための開発が進められている。

【0 0 0 3】

このような開発例として、例えば、開昭 6 2 - 0 0 0 4 1 5 号公報、特公平 0 1 - 0 4 4 3 2 0 号公報、特開平 0 1 - 2 5 4 1 6 4 号公報、特公平 0 6 - 0 0 4 6 7 9 号公報、特開平 1 1 - 1 3 9 9 8 6 号公報、特開平 1 1 - 2 7 6 8 7 6 号公報、特許第 2 9 9 7 7 5 8 号、特許第 2 9 9 0 2 3 9 号、特開平 1 1 - 2 5 3 1 5 5 号公報、特願 2 0 0 2 - 2 3 0 6 5 6 号、特願 2 0 0 2 - 1 4 8 8 4 9 号、特開 2 0 0 1 - 1 6 3 8 9 9 号公報のものが挙げられる（特許文献 1 から 1 2 参照）。

【0 0 0 4】

これらの絹新素材開発の過程で、絹タンパクは細胞生育性、抗酸化性、抗菌性、アルコール消化性、抗血液凝固性等、多様な機能を有することが明らかにされた。

しかし、それらの機能が絹タンパクのどのような部位または構造に起因するかについてはまだ明らかになってはいない。

本発明者らは絹タンパクの有する細胞生育機能に注目し、繭糸または絹糸を溶解した後に、これを粉末、フィルム、ゲル等に変え、これらをスキンケア素材として創傷被覆材や化粧品、合成繊維の改質として利用するための開発と機能の研究を進めてきた（例えば、特許文献 8、特許文献 9、特許文献 1 0、特許文献 1

1、特許文献12参照)。

その過程で、絹タンパクを構成するフィブロインのH鎖とL鎖およびセリシンのa成分にはヒト正常皮膚由来線維芽細胞を生育促進する作用のあることが分かった(例えば、特許文献13、特許文献14、特許文献15参照)。

【0005】

一方、繭糸は繊維として衣服以外の分野、例えば、繭を各種加工工程を経て生糸、さらに絹織物に加工して、医療(手術用縫合糸)や化粧(パフ)等の分野で利用されているが、最近、このような繭や生糸の加工工程で絹タンパクの分子量は低下することが分かってきた。

また、繭糸や絹糸を粉末、フィルム、ゲル等に変える加工工程(特に、繭糸や絹糸の溶解工程)においても絹タンパクの分子量は低下することが分かってきた[H.Yamadaら著:Materials Science & Engineering C,14,P.41-46(2001)]、[坪内紘三、山田弘生、高須陽子:日本蚕糸学会誌、71巻、1号、P.1-5(2002)](非特許文献、非特許文献2参照)。

【0006】

このような加工により分子量の低下した絹タンパクは、電気泳動像では分子量約1~20万の間に1つのスメアーでブロードなバンドが見えるのみである。

分子量約1万程度以下は透析等の工程で除外されてしまうが、実際はアミノ酸やペプチド程度にまで分子量が低下している。

分子量が低下した絹タンパクはヒト細胞生育促進性が低下し、あるいは細胞生育を阻害していることが分かった(特許文献11参照)。

【0007】

つまり、未分解フィブロイン、未分解セリシンは細胞生育促進性が優れているにもかかわらず、繭加工過程の酸やアルカリ、光、熱等の処理によるペプチド結合の複雑な、または不均一な切断のため分子量低下とともに細胞生育の阻害が生じている。

したがって、絹タンパクの細胞生育促進機能を利用するためには未分解絹フィブロイン、未分解絹セリシンあるいはフィブロインのH鎖(分子量約35万)、L鎖またはセリシンa(分子量約40万)等を未分解の状態で利用することが好

ましい。

【 0 0 0 8 】

しかし、これら 3 成分（特に H 鎖やセリシン a）は分子量が非常に大きく、一定の性状で長期保存するための安定性が低い。

また、L 鎖はフィブロイン中で 1 0 % 以下の重量割合で含まれているに過ぎなく、量的に少ない。

さらに、これら 3 成分について、各成分のどの部分に細胞生育促進作用があるかを明らかにした報告は、未だなされていない。

【 0 0 0 9 】

【特許文献 1】

開昭昭 6 2 - 0 0 0 4 1 5 号公報

【特許文献 2】

特公平 0 1 - 0 4 4 3 2 0 号公報

【特許文献 3】

開昭平 0 1 - 2 5 4 1 6 4 号公報

【特許文献 4】

特開平 0 4 - 2 0 2 4 3 5 号公報

【特許文献 5】

特公平 0 6 - 0 0 4 6 7 9 号公報

【特許文献 6】

特開平 1 1 - 1 3 9 9 8 6 号公報

【特許文献 7】

特開平 1 1 - 2 7 6 8 7 6 号公報

【特許文献 8】

特許第 2 9 9 7 7 5 8 号

【特許文献 9】

特許第 2 9 9 0 2 3 9 号

【特許文献 1 0】

特開平 1 1 - 2 5 3 1 5 5 号公報

【特許文献 1 1】

特願 2 0 0 2 - 2 3 0 6 5 6 号

【特許文献 1 2】

特願 2 0 0 2 - 1 4 8 8 4 9 号

【特許文献 1 3】

特開 2 0 0 1 - 1 6 3 8 9 9 号公報

【特許文献 1 4】

特願 2 0 0 1 - 1 8 0 1 6 9 号公報

【特許文献 1 5】

特開 2 0 0 2 - 1 2 8 6 9 1 号公報

【非特許文献 1】

H.Yamadaら著：Materials Science & Engineering C, 14, P.41-46(2001)

【非特許文献 2】

坪内紘三、山田弘生、高須陽子：日本蚕糸学会誌、7 1 巻、1 号、P.1-5(2002)

【非特許文献 3】

Tashiro Yutaka and Otsuki Eiichi , Journal of Cell Biology, Vol, 46, P1(1970)

【0 0 1 0】

【発明が解決しようとする課題】

フィブロインのH鎖やセリシンのa成分は細胞生育促進性に優れているが、分子量が30万以上の高分子量であり、結晶化しやすい。

これに比べてフィブロインのL鎖は分子量2.5万であり、H鎖やa成分と比較すれば分子量は小さいが、通常のタンパクと比べれば、結晶に成りやすい性質を持っている。

また、フィブロインのH鎖とL鎖の重量比はほぼ13(H鎖)対1(L鎖)であり、L鎖の割合は非常に少ない。

このような高分子量で結晶性のタンパクは水溶液において安定性が低い。

また、油成分等の医薬品や化粧品添加物を加えるとゲル化し易く、性状が不安定で、長期(1年以上)の貯蔵に対する安定性が低い。

【0011】

一方、絹フィブロインH鎖やセリシンaより分子量が低く、細胞生育性に優れた物質としては各種細胞の増殖因子、例えば分子量1.77～1.9万の線維芽細胞増殖因子（FGF）がある。

これらは腫瘍やガン化した細胞、または急激に増殖している細胞から分泌され、その中には皮膚潰瘍治療剤として使われているものもある（フィブラストスプレー、科研薬品株式会社）が、安全性に問題がある。

本発明は、このような問題点を解決するためになされたものである。

即ち、腫瘍細胞などの異常な細胞によって産生された細胞増殖因子とは異なり、安全性に優れ、比較的低分子量で安定性にも優れ、かつ細胞生育促進性に優れたペプチドを得ることを目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記問題点を解決するために、鋭意研究を重ねた結果、絹フィブロインの特定の部位のペプチド鎖に細胞生育促進機能があることを突き止めることに成功し、本発明を完成するに至ったものである。

即ち、本発明は、（１）、絹タンパクを構成する非結晶部のペプチド鎖から選ばれる１又は２以上のペプチド鎖の部分ペプチドを含有してなり、該部分ペプチドはアミノ酸残基数が少なくとも４～３２からなる特定のアミノ酸配列を有するペプチドであることを特徴とする細胞生育促進性に優れたペプチド組成物に存する。

更に詳しくは、家蚕の絹フィブロインのH鎖を構成するN末端部（I）、非結晶部（A）、及びC末端部（a）の各ペプチド鎖、L鎖のペプチド鎖、並びに天蚕の絹フィブロインを構成するN末端部（I）、非結晶部（A）、及びC末端部（a）の各ペプチド鎖、から選ばれる１又は２以上のペプチド鎖の部分ペプチドを含有してなり、該部分ペプチドはアミノ酸残基数が少なくとも４～３２からなる特定のアミノ酸配列を有するペプチドである細胞生育促進性に優れたペプチド組成物に存する。

【0013】

そして、(2)、上記特定のアミノ酸配列を有するペプチド鎖が、次の(1)～(8)のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチド組成物に存する。

- | | |
|-----------|------------------------------|
| (1) A-6-2 | VITDSDGNE |
| (2) A-6-6 | NINDFDED |
| (3) SfHE | AASSVSSASSRSYDYSRRNVRKN |
| (4) SfHA | GSSGFGPYVAHGGYSGYEYAWSESDFGT |
| (5) AfH 1 | YGWGDGGYGSDS |
| (6) AfH 5 | DEYVDN |
| (7) AfH 6 | VETIVLEEDPYGHEDIYEED |
| (8) AfH 7 | DDGFVLDGGYDSE |

【0014】

そしてまた、(3)、次の(1)～(8)のいずれかのアミノ酸配列を含有する細胞生育促進性に優れたペプチドに存する。

- | | |
|-----------|------------------------------|
| (1) A-6-2 | VITDSDGNE |
| (2) A-6-2 | NINDFDED |
| (3) SfHE | AASSVSSASSRSYDYSRRNVRKN |
| (4) SfHA | GSSGFGPYVAHGGYSGYEYAWSESDFGT |
| (5) AfH 1 | YGWGDGGYGSDS |
| (6) AfH 5 | DEYVDN |
| (7) AfH 6 | VETIVLEEDPYGHEDIYEED |
| (8) AfH 7 | DDGFVLDGGYDSE |

【0015】

そしてまた、(4)、家蚕の未分解絹タンパク又は天蚕の未分解絹フィブロインを、加水分解した後、分子量分画により細胞生育促進性に優れた非結晶部のペプチドを分離、取得する方法に存する。

【0016】

そしてまた、(5)、加水分解を希酸、ヒドロキシルアミン又は蛋白分解酵素により行うことを特徴とする上記第4の発明の細胞生育促進性に優れた非結晶部のペプチドを分離、取得する方法に存する。

【0017】

そしてまた、(6)、(7)、それぞれ上記(1)、(2)のペプチド組成物及び(3)のペプチドを含有する細胞増殖促進剤に存する。

【0018】

そしてまた、(8)、(9)、それぞれ上記(1)、(2)のペプチド組成物及び(3)のペプチドを含有する創傷治癒促進剤に存する。

【0019】

そしてまた、(10)、(11)、それぞれ上記(1)、(2)のペプチド組成物及び(3)のペプチドを含有する化粧品に存する。

【0020】

そしてまた、(12)、(13)、それぞれ上記(1)、(2)のペプチド組成物及び(3)のペプチドを含有する細胞培養基材に存する。

【0021】**【発明の実施の態様】**

本発明の細胞生育促進性に優れた絹タンパクの非結晶部のペプチドまたはそれらのペプチド組成物は、次の操作により取得すると共に、そのアミノ酸配列を決定した。

【0022】

(1) 家蚕又は天蚕の繭層を精練し、精練した繭層をLiSCN水溶液に溶解して遠心分離機にかけ、その上清液を分離、回収して水に対して透析し、透析液を再度遠心分離機にかけて上清液を分離、回収する。

(2) 分離、回収した精製上清液に、キモトリプシン等の蛋白分解酵素を添加して加水分解処理する。

(3) 加水分解処理した液の上清液(非結晶部分)を沈澱層(結晶部分)から分離、回収する。

(4) 上清液(非結晶部分)を逆相クロマトグラフィーにより分画する。

(5) 逆相クロマトグラフィーにより分画した各画分について細胞培養を行う。

(6) 細胞生育性に優れている画分についてゲルろ過クロマトグラフィーにより分子量分画し、対照区より2倍以上の細胞生育率を有する画分(ペプチド鎖)に

ついてアミノ酸配列を決定する。

(7) 得られたペプチドをもとに細胞生育促進性に優れたペプチドを設計して合成する。

【0023】

そして、本発明は、分子量が1万以下、好ましくは3,000以下の優れた細胞生育促進性を有するペプチドを絹タンパクの非結晶部から分離、分収すると共に、それらと類似のペプチドを合成し、それらペプチドを細胞増殖促進剤、創傷治癒促進剤、化粧品等のスキンケア用素材や細胞培養基材などのバイオ素材として提供することができるものである。

【0024】

本発明における絹タンパク由来の細胞生育促進ペプチドとは、実施例で述べるように3日間の細胞培養試験に置いて、ペプチドを添加しないで細胞を培養する対照区より2倍以上の細胞生育率を有するペプチドを言う。

【0025】

家蚕フィブロインの1次構造

家蚕の場合、蚕は営繭時に絹タンパクを吐糸して、繭（繭糸と蛹で構成）を作る。

繭糸には中心部にフィブロイン、周囲部にセリシンが存在し、存在比は、(70～80%フィブロイン)：20～30%(セリシン)であることが知られている。

繭糸（フィブロインとセリシンをまとめて、あるいは単独で絹タンパクという）のフィブロインは分子量約37万である。

[Tasiro Yutaka and Otsuki Eiichi, Journal of Cell Biology, Vol, 46, P1 (1970)]（非特許文献3参照）。

【0026】

分子量約37万のフィブロインは分子量約35万（H鎖）と約2.5万（L鎖）がS-S結合している。

フィブロインのH鎖は非常に高分子量であるが、類似したアミノ酸残基配列の繰り返して構成されている。

【0027】

ゲノムバンク (Gen Bank accession no. AF 226688) によれば、H鎖の前駆体タンパクは次のようにN末端部(I)、結晶部(R)と非結晶部(A)の繰り返し部、C末端部(a)から成っている。

繰り返し部は12の結晶部(R01～R12)が11の非結晶部(A01～A11)を介して繰り返している。

【0028】

結晶部は、結晶性の高い(Gly-X)のジペプチドの長い繰り返しから成っている。

Xとしては結晶性の高いAla(A)の他にSer(S)が主で、その他にTyr(Y)、Val(V)などがマイナー成分として存在している。

特に、GAGAGS、またはGAの繰り返しが多い。

その結果、結晶部ではGとAの和が50%を超え、70%程度以上になっている。

【0029】

非結晶部のA01～A11のペプチドはアミノ酸配列は似ているが、各ペプチドのアミノ酸配列に少しの違いが見られる。

また、非結晶部(A01～A11)のGとAの和は50%以下である。

N末端部とC末端部はアミノ酸配列およびアミノ酸組成から、非結晶部と考えられ、A01～A11と同様にGとAの和は50%以下である。

ところが、非結晶部の中でも6～10残基程度の部分ペプチドとしては、GとAの和が50%を超える部分が存在する。

【0030】

<フィブロインH鎖前駆体>

I-R01A01R02A02R03A03R04A04R05A05R06A06R07A07R08A08R09A09R10A10R11A11R12-a

【0031】

N末端部: I

N末端部(I)はイニシアルペプチドの部分で、アミノ酸配列は次の通りであ

る。

MRVKTFVILCCALQYVAYTNANINDFDEDYFGSDVTQSSNTTDEIIRDASGAVIEEQITTKMQRKKNH
ILGKNEKMIKTFVITDSDGNESIVEEDVLMKTLSDGTVAQSYVAADAGAYSQSGPYVNSNGYSTHQGYTSD
FSTSAAV

【 0 0 3 2 】

結晶部：R 0 1、R 0 2、…、R 1 2

R 0 1、R 0 2、…、R 1 2 はいずれも結晶部と言われている部位で、各アミノ酸残基数はいずれも 3 0 0 以上である。ただし、R 1 2 のアミノ酸残基数は 5 4 である。

(A 0 1 ~ A 1 1) いずれの結晶部も G と A の和が 7 0 % 程度以上である。

【 0 0 3 3 】

非結晶部：A 0 1、A 0 2、…、A 1 1

アミノ酸残基数 2 8 ~ 3 2 から成り、非結晶部 (A) と言われている。

それらのアミノ酸配列は次の通りである。

A 0 1	GSSGFGPYVANGGYSRSDGYEYAWSSDFGT
A 0 2	GSSGFGPYVAHGGYSGYEYAWSSDFGT
A 0 3	GSSGFGPYVANGGYSGYEYAWSSDFGT
A 0 4	GSSGFGPYVAHGGYSGYEYAWSSDFGT
A 0 5	GSSGFGPYVAHGGYSGYEYAWSSDFGT
A 0 6	GSSGFGPYVANGGYSGYEYAWSSDFGT
A 0 7	GSSGFGPYVANGGYSGYEYAWSSDFGT
A 0 8	GSSGFGPYVANGGYSGYEYAWSSDFGT
A 0 9	GSSGFGPYVNGGYSGYEYAWSSDFGT
A 1 0	GSSGFGPYVANGGYSGYEYAWSSDFGT
A 1 1	GSSGFGPYVANGGYSRREGYEYAWSSKDFET

【 0 0 3 4 】

C 末端部：a

C 末端側の非結晶部位でアミノ酸配列は次のように成っている。

AASSVSSASSRSYDYSRRNVRKNCGIPRRQLVVKFRALPCVNC

【0035】

本発明の理解の便宜、参考のために、以下に、タンパクにおけるアミノ酸またはアミノ酸残基の表記法、アミノ酸の荷電特性等について記載しておく。

1文字	3文字	アミノ酸	1文字	3文字	アミノ酸
A	Ala	アラニン	M	Met	メチオニン
C	Cys	シスチン	N	Asn	アスパラギン
D	Asp	アスパラギン酸	P	Pro	プロリン
E	Glu	グルタミン酸	Q	Gln	グルタミン
F	Phe	フェニルアラニン	R	Arg	アルギニン
G	Gly	グリシン	S	Ser	セリン
H	His	ヒスチジン	T	Thr	スレオニン
I	Ile	イソロイシン	V	Val	バリン
K	Lys	リジン	W	Trp	トリプトファン
L	Leu	ロイシン	Y	Tyr	チロシン

【0036】

アミノ酸は側鎖の特徴から下記のように酸性アミノ酸、極性非荷電アミノ酸、非極性アミノ酸、塩基性アミノ酸の4つに分けられている。

- (1) 酸性アミノ酸 : E、D
- (2) 極性非荷電アミノ酸 : N、S、Q、Y、T、C、F
- (3) 非極性アミノ酸 : A、G、V、P、L、I、W
- (4) 塩基性アミノ酸 : H、K、R

【0037】

次に示すフィブロインL鎖はH鎖の結晶部と非結晶部のアミノ酸配列と比べれば非結晶部である。

<フィブロインL鎖のアミノ酸配列>

MKPIFLVLLVATSAYAAPSVTINQYSDNEIPRDIDDGKASSVISRAWDYVDDTDKSIAILNVQEILKDMASQ
GDYASQASAVAQTAGIIAHLISAGIPGDACAAANVINSYTDGVRSGNFAGFRQSLGPFFGHVGQNLNLINQLV
INPGQLRYSVGPALGCAGGGRIYDFEAAWDAILASSDSSFLNEEYCIKRLYNSRNSQSNNIAAYITAHLLP
PVAQVFHQSGSITDLLRGVGNNDATGLVANAQRYIAQAASQVHV

【 0 0 3 8 】

これに対し、野蚕の絹タンパクのアミノ酸配列は家蚕と異なるが、野蚕の中で *Antheraea* に属する天蚕、サク蚕、エリ蚕、ムガ蚕、タサール蚕等はほぼ同じアミノ酸配列をしている。

天蚕フィブロインでは 1 0 残基以上のアラニン（A）のみの繰り返しから成っている部分を結晶部、それ以外を非結晶部とする。

家蚕フィブロインと比べ、結晶部と非結晶部の各繰り返し部の、残基数が少ない。

1 0 残基以上アラニンが続いている結晶部を除き天蚕フィブロインの非結晶部のアミノ酸配列を次に示す。

アミノ酸組成から N 末端部及び C 末端部も非結晶部である。

【 0 0 3 9 】

<天蚕フィブロインの非結晶部の一次構造>

N 末端部：イニシアルペプチド

MRVTAFVILCCALQYATANNLHHHDEYVDNHGQLVERFTTRKHYERNAATRPHLSGNERLVETIVLEEDPYG
HEDIYEEDVVINRVPGASSSAAAASSASAGSGQTIIVERQASHGAGGA

【 0 0 4 0 】

非結晶部：

AGAAAGAAAGSSARGG

SGFYETHDSYSSYSGSSSAAAASSGAGGAGGGYGWGDGGYGSDS

GSGAGGRGDGGYGSGSS

RRAGHDHAAGSSGGGYSWDYSSYGSES

GSGAGGVGGGYGGGDGGYGSGSS

RRAGHDRAAGS

SGAGGSGGGYGWGDGGYGSDS

GSGAGRAG
GDYGWGDGGYGS
RQAGHERAAGS
SGAGSGRGYGWGDGGYGS
GSGAGGAGGDYGWGDGGYGS
GSGAGGAGGDYGWGDGGYGS
SGAGGAGGGYGWGDGGYGS
SGAGGAGGYGGYGS
SGAGSGGGYGWGDGGYGS
GSGAGGVGGYGWGDGGYGS
SGAGGRGDGGYGS
GSGAGGAGGGYGWGDGGYGS
RRAGHDRAAGC
SGAGGTGGYGWGDGGYGS
SGAGSGGGYGWGDGGYGS
SGAGRSGGYGWGDGGYSS
SGAGSGGYGGYGS
GSGAGGVGGYGWGDGGYGGYGS
GSGAGGVGGYGRGDSGYGS
GHGRSSGS
SGAGSGGGYGWYGSYGS
SSGAGSGGGYGWYGGYGS
GSGAGSGGGYGWGDGGYGS
SRRAGHDRAYGAGS
GAGASRPVGIYGTDDGFVLDGGYDSEGS

【 0 0 4 1 】

C 末端部：

SSSGRSTEGHPLLSICCRPCSHRHSYEASRISVH

【 0 0 4 2 】

ところで、本発明では細胞生育促進性に優れた絹タンパク成分に関して、各成分のどの部分に細胞生育促進性があるかを分析してきたところ、非結晶部に細胞生育促進性があることが明らかになった。

フィブロインの非結晶部とは上記したアミノ酸配列部分である。従って、非結晶部にはN末端部およびC末端部も含まれている。

【0043】

家蚕フィブロインの非結晶部のA01～A11（28～32残基のペプチド）では、いずれも同様の優れた細胞生育性を示すが、A01～A11は全く同じアミノ酸配列ではない。

A11の場合、他のA01～A10とは32残基の内の8残基以内でアミノ酸残基配列が異なる。

したがって、30%程度以下のアミノ酸残基配列に違いがあっても細胞生育性に影響はない。

しかし、細胞生育促進性を保つにはアミノ酸配列の違いは50%以下が好ましい。

【0044】

ところで、非結晶部のペプチドを合成する場合、約30残基のアミノ酸配を合成するのはあまり効率的ではない。

非結晶部に存在するN-G結合のペプチドを特異的に切断するヒドロキシルアミン（NH₂OH）で処理すれば11ヶの非結晶部のうちの8ヶは約10残基と約20残基に分けられる。

このように特異的なペプチド結合が切断された場合は細胞生育性に影響はほとんどない。

このような10～20残基のアミノ酸配列を合成するのはより効率的である。

【0045】

一方、アミノ酸残基数が非常に少ないペプチドでは細胞生育促進性が発現しない。

特に、アミノ酸が2残基以下では細胞生育を粗害することがある。

したがって、細胞生育促進ペプチドとしては4～32残基、好ましくは6～1

2 残基のペプチドがよい。

さらに、非結晶部においても塩基性アミノ酸残基をほとんど含まず、酸性アミノ酸残基およびまたは極性非荷電アミノ酸を多く含む部分ペプチドが細胞生育促進性に優れていることが分かった。

特に、酸性アミノ酸残基は極めて優れた細胞生育促進性を示した。

【0046】

非結晶部は、全体としては優れた細胞生育促進性を示すが、部分としてはGとAの和が55%を超え、また塩基性アミノ酸残基が多いため、胞生育率の低いアミノ酸配列部がある。

そこで、フィブロインの非結晶部から酸性アミノ酸が存在し、そしてまたは極性非荷電アミノ酸が存在する。

また、塩基性アミノ酸がほとんど存在しない部分ペプチドを分離、回収する。

回収した部分ペプチドの中から細胞生育率がペプチド無添加を対照区とした細胞生育率の2倍以上の値を示すペプチドをSDFGPとする。

【0047】

その条件としては、非結晶部の部分ペプチドにおいて

(1) GとAの残基数の和がペプチドの全残基数に対して55%以下である。

GやAが多いと結晶になりやすいためである。

(2) 塩基性アミノ酸残基数はペプチドの全残基数に対して25%以下である。

(3) 酸性アミノ酸およびまたは極性非荷電アミノ酸が存在する。

という事項を満たすことが必要であり、このことは表6に示したところから容易に推考される。

【0048】

因みに、アミノ酸またはペプチドの性質は側鎖の化学構造によって異なる。

酸性アミノ酸は細胞生育促進性に優れていても、EとDでは側鎖の長さが異なるため、側鎖や主鎖の柔軟性や立体構造が異なり、同じ細胞生育促進性を示さない。

このことは極性非荷電アミノ酸や塩基性アミノ酸といわれる各種のアミノ酸についても、同様にいえることで、物理化学的性質がそれぞれ異なるため同じ細胞

促進性や阻害性を示すわけではない。

【0 0 4 9】

実際に、絹タンパクから部分ペプチドを分離、回収する場合は特異的なペプチド結合を切断するタンパク分解酵素またはその他の化学物質で絹タンパクを切断し、断片の中から非結晶部に属しているペプチドを回収する。

また、得られた部分ペプチドをもとに細胞生育に優れたペプチドを設計し、合成することができる。

【0 0 5 0】

1. 絹タンパクからペプチドの分離、回収

絹タンパクの非結晶部を分離、回収するには、非結晶部の特徴を利用するとよい。

非結晶部は水に溶けやすいので、絹物質を中性付近（P H 5 . 0 ～ 9 . 0）の水に浸漬すればよい。

しかし、単に絹物質を浸漬するだけでは効率よく非結晶部のペプチドを得ることができない。

そこで、絹タンパクの特異的なペプチド結合を積極的に切断する。

このようなペプチド結合の切断方法としては、特異的なペプチド結合を積極的に切断する化学物質や酵素等を用いることが好ましい。

以下にこのことを述べる。

【0 0 5 1】

1) 原料

家蚕ではフィブロインのH鎖、L鎖およびセリシンのa成分が残っている絹タンパクを原料とする。

【0 0 5 2】

野蚕（天蚕、サク蚕、エリ蚕、ムガ蚕、タサール蚕等）では、フィブロインの電気泳動像にH鎖と同程度に明確なバンドが認められる場合を原料とする。

原料はフィブロイン、セリシン単独でもフィブロインとセリシンが同時に存在していてもよい。

【0 0 5 3】

したがって、本発明の原料物質は繭糸、生糸、絹織編物、絹糸（フィブロイン繊維）、それらの残糸、またはそれらを原料とした繊維、粉末、フィルム等、家蚕および野蚕等の絹糸虫類が吐糸する蛋白質繊維物質（絹物質）すべてを対象とすることができる。

しかし、これらの原料には家蚕フィブロインH鎖、セリシンのa成分、野蚕ではそれらに相当する成分が存在する必要がある。

フィブロインのH鎖はL鎖より分解しやすいので、H鎖の一部でも残っていればL鎖のほとんどが分解しないで残っている。

【0 0 5 4】

2) 原料の溶解

中性塩で溶解される前記1.の原料は精練物、半精練物、未精練物およびそれらの中間物であってもよい。

セリシン蚕繭糸でもよい。

重要なことはそれらの絹タンパクが未分解であるか、あるいは各種の加工工程を経てもフィブロインのH鎖、セリシンのa成分およびそれらに相当するタンパクの一部が未分解で残されていることである。

H鎖やa成分等が存在するかどうかの確認は電気泳動像で、それぞれに相当するバンドの存在を確認することで行う。

【0 0 5 5】

原料絹糸の溶解剤である中性塩としては、例えば塩化カルシウム、銅エチレンジアミン、チオシアン酸ナトリウム、チオシアン酸リチウム、臭化リチウム、硝酸マグネシウム等の中性塩が挙げられる。

当該中性塩においても飽和水溶液又は50%〔重量(g)/容量(ml)〕飽和以上の濃度が好ましい。

フィブロインとセリシンが含まれている場合、例えば繭糸や未精練物、半精練等は上記中性塩で絹糸と同様に溶解する。

【0 0 5 6】

一方、セリシン蚕繭糸のようにセリシンが98%以上の場合は8M尿素で70～90℃、10分以内で溶解する。

また、セリシン蚕繭糸は 9 M LiBr でも室温（2 0 ～ 3 0 ℃）で 3 0 分以内に溶解できる。

溶解時の条件はこれらの条件に準じてかえて行う。

【 0 0 5 7 】

絹物質を中性塩溶液に溶解する工程では、中性塩にメチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール等のアルコールを添加してもよい。

中性塩として塩化カルシウムを使う場合は 9 4 ℃以下の温度で、望ましくは 7 5 ～ 8 5 ℃程度の温度で行う。

臭化リチウムを使う場合は 5 0 ℃程度以下の温度で原料を溶解する等、中性塩によって溶解条件は異なるが、フィブロインの H 鎖、セリシンの a 成分が残るような、またはそれに相当する溶解方法を行う。

【 0 0 5 8 】

絹物質の溶解においては、

- (1) 攪拌することにより溶解を促進することができる。
- (2) 溶解温度が低いと溶解しにくい。

溶解温度が高いと溶解し易いが、分子量低下が激しく起きる。

絹を中性塩で溶解した溶解液には、フィブロインあるいはフィブロインとセリシンの混合物のほかに中性塩、アルコール等が含まれている。

この溶解液から、まず不溶物を除去し、次いで透析膜や透析装置を用いて分子量約 5, 0 0 0 以下の低分子物を除去する。

このような透析によって絹タンパク水溶液を得る。

【 0 0 5 9 】

3) 酵素による分解と回収

一般に、タンパク分解酵素によるタンパクの切断は特異的なペプチド結合で起き、切断が穏和な条件下で行われるため、アミノ酸残基側鎖の修飾が起こらないと言われている。

また、タンパクの非特異的切断による断片の複雑化を避けることもできる。

【 0 0 6 0 】

このような酵素には、

リジルエンドペプチターゼ、セリンプロテアーゼ、メタロエンドペプチターゼ、アルギニルエンドペプチターゼ、メタロプロテアーゼ、キモトリプシン、パパイイン、アルカラゼ、ペプシン、レンニン、パンクレアチン、エラスターゼ、カルボキシペプチターゼ、アミノペプチターゼ、ジペプチターゼ等がある。

これらの中で、結晶部と非結晶部を分けるには、キモトリプシンが特に好ましい。

【0061】

絹タンパク水溶液にタンパク分解酵素を添加すると、絹タンパクは特異なペプチド結合間で切断される。

切断された絹タンパク由来のペプチドが主に絹タンパクの結晶部由来の断片であれば凝集しやすく、凝集（凝固）すれば沈澱する。

凝集しにくい場合でも、結晶部由来のペプチドほど凝集しやすいので、凝集剤としてアルコール（メチルアルコール、エチルアルコール等）等を添加すれば結晶部由来ペプチドから凝集し始め、沈澱する。

【0062】

沈澱物を除去すれば、残りは非結晶部由来ペプチドの溶液である。

沈澱物の除去には、沈澱物を含んだ溶液を遠心分離機（1,000～10,000 G）で分け、沈澱物を除く。

沈澱物を除いた液は非結晶部から分離された非結晶部分のペプチドの水溶液である。

これを乾燥すれば、フィルム状あるいは粉末状のペプチドが得られる。

このペプチドに結晶部の部分ペプチドが50%程度以下であれば含まれていてもよい。

【0063】

しかし、非結晶性部由来のペプチドであっても細胞生育促進性に優れたペプチドを得るには、グリシンとアラニン残基数の和が、55%を越えないことが好ましい。

また、塩基性アミノ酸残基数がペプチド構成残基数の25%以下であることが好ましい。

一方、酸性アミノ酸残基や非極性荷電アミノ酸残基は多いほどよい。

特に、酸性アミノ酸残基数が多いと細胞生育促進性に優れる。

乾燥は凍結乾燥法やスプレードライ法で乾燥する。

非結晶部由来のペプチドは乾燥後に結晶化していても、低分子量であるため水に溶けやすい。

【 0 0 6 4 】

2. 絹タンパク由来線維芽細胞増殖ペプチド(SDFGP)の合成

絹タンパクから分離、回収したSDFGPとしては次のペプチドがある。

これらは、SDFGPの一例である。

さらに (0 0 4 7) の条件を満たす多くのSDFGPが存在することはいうまでもない。

A-6-2	VITTDSDGNE
A-6-6	NINDFDED
SfHE	AASSVSSASSRSYDYSRRNVRKN
SfHA	GSSGFGPYVAHGGYSGYEYAWSSSESDFGT
AfH 1	YGWGDGGYGS
AfH 5	DEYVDN
AfH 6	VETIVLEEDPYGHEDIYEED
AfH 7	DDGFVLDGGYDSE

優れた細胞生育促進性はこれらのSDFGPの一部のアミノ酸配列のみでもSDFGPとなり得る。

また、32残基以内でこれらのペプチドが繰り返されたり、別のペプチドと連結してもよい。

【 0 0 6 5 】

しかし、アミノ酸の状態では細胞生育促進機能を有していない。

機能を有する細胞生育アミノ酸残基数は4残基以上必要とする。

しかし、ペプチド合成の効率から32残基以下が好ましい。

SDFGPの合成は、絹タンパクの非結晶部のアミノ酸配列を模倣し、(0 0 4 7) の条件を満たすペプチドを合成する。

合成ペプチドのアミノ酸残基は4～32、好ましくは6～12残基である。

この場合、絹タンパクのアミノ酸配列と完全に同じでなくてもよい。

【0066】

例えば、フィブロインH鎖の非結晶部(A01～A11)のアミノ酸配列は全部が同じでないが、細胞生育促進性はほぼ同じである。

したがって、アミノ酸配列に30%程度以下の違いがあってもよいが、アミノ酸配列の違いは50%以下が好ましい。

この場合、酸性アミノ酸は多いほどよく、極性非荷電アミノ酸はある方が好ましい。

しかし、塩基性アミノ酸はほとんどない方が好ましい。

【0067】

つまり、各SDFGPのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置き換わってもよい。

この場合、塩基性アミノ酸残基はペプチドを構造するアミノ酸残基数の少なくとも25%以下となるようにする。

一方、ペプチド(SDFGP)における酸性アミノ酸は多い方が好ましい。

全アミノ酸残基が酸性アミノ酸およびまたは非極性荷電アミノ酸で構成されていてもよい。

【0068】

したがって、A-6-2からDSDGDE、A-6-6からDEDEDE、EDEDED、SfHAからSSESSEやYGGYGY、AfH1からDGGYGGD、AfHSからDEYDEY、AfHGからYEEDYEED等、さらにEEEEEE、DDDDDD、EGSEGSなど多くのペプチドがSDFGPとなり得る。

これらのペプチドが繰り返されたり、別のペプチドと連結してもよいことは言うまでもない。

【0069】

4. 利用

絹タンパクの非結晶部から得たペプチド集合物およびSDFGPは細胞生育促進性に優れているだけでなく、水に溶けやすい。

また、分子量が3,000程度以下であるため溶解している状態でも長期間形態が安定である。

さらに、各種のSDFGPを混合すると単独であるより細胞生育は促進される。

したがって、細胞培養液、化粧水、乳液、クリーム、軟膏、食品等にこれらを混合して添加する。

本発明のペプチド集合物およびSDFGPは皮膚細胞を生育促進する作用に優れているため、スキンケア用素材として、また、細胞培養素材として上記以外の分野、例えば衣類繊維、化粧粉末、樹脂等の改良でも優れた素材である。

【0070】

【実施例1】

絹フィブロインの酵素分解物の細胞生育活性

(1) 絹タンパクの非結晶部を酵素で分解、分離、分収

家蚕の繭を切開して蛹を除き、繭層(10g)を30倍量の8M尿素、90℃に10分浸漬し、セリシンを抽出した。

抽出残さは水洗、乾燥しこれをフィブロインとした。

【0071】

フィブロイン1.0gを9M LiSCN 10mlに浸漬して溶かし、これに蒸留水10ml加えて、これを3,000rpm、10分間遠沈した。

上清液を半透膜に入れ50倍量の水に対して透析した。

透析は、30分ごとに透析外液の水をかえて4回行った。

透析後に液を再び遠沈し、上清液に0.1Mリン酸水素二ナトリウム(pH8.5)を加え、pHを7から8に調製した。

そこにフィブロイン量の100分の1量のキモトリプシンを入れ、40℃で4時間置いたところ沈澱を生じた。

【0072】

このときの上清液のタンパクをあるいはペプチドについて、フィブロインの非結晶部(A)からえられたものを非結晶部分(A')、沈澱物のタンパクあるいはペプチドを結晶部(C)からえられたものを結晶部分(C')、とした。

結晶部分は水洗し、9M LiSCN 1mlに溶解し、50倍量の水で前述と同様に半透膜で透析し、水溶液のタンパク量を測定した。

上清はそのままタンパク量を測定した。

【0 0 7 3】**(2) 細胞培養容器へコーティング**

これらの結晶部分 (C') 及び非結晶部分 (A') の水溶液をそれぞれ 0. 0 2 5 %、0. 0 0 2 5 % の濃度になるように 7 0 % エタノールを加えて調製し、それをポリスチレンのシャーレ (3 5 m m ϕ 、ファルコン) に 1 m l ずつ入れて風乾した。

対照区用シャーレは 7 0 % エタノールのみを 1 m l 入れて風乾した。

【0 0 7 4】**(3) 細胞培養**

細胞は三光純薬から購入した (凍結) ヒト皮膚線維芽細胞 (成人の正常皮膚由来) を使用した。

培地はクラボウから購入したヒト皮膚線維芽細胞増殖用低血清培地 (Medium 1 0 6 S 5 0 0 m l に L S G S 1 0 m l を添加) を使用した。

シャーレ 1 枚につき培地 2 m l を入れ、8 万ケの細胞を接種し、3 日間培養した。

【0 0 7 5】**(4) アラマーブルー色素での生細胞数の測定**

シャーレ 1 枚につき培地 2 m l、アラマーブルー (I W A K I) 0. 1 m l の割合で入れ、3 7 $^{\circ}$ C、2 時間培養したのち、5 7 0 n m、6 0 0 n m の吸光度から計算したアラマーブルー色素の還元量を生細胞数とした。

絹タンパクの成分無添加の場合を対照区 (1 0 0 %) とした、結晶部分及び非結晶部分をコートしたシャーレでのヒト皮膚線維芽細胞の生育を表 1 に示す。

【0 0 7 6】

絹タンパク成分をコートしたシャーレでの細胞生育率は対照区と比べてすべて高い値を示した。

特に、非結晶部分 (C') の 0. 0 2 5 % 濃度の生育率が高く、SDFGP の混合物である。結晶部分では濃度の濃い方 (0. 0 2 5 %) が薄い方 (0. 0 0 2 5 %) より生育が悪かった。

これは、結晶部分の絹タンパクは細胞生育を阻害しているためと考えられる。

【0077】

【実施例 2】

細胞生育促進ペプチドのアミノ酸配列

フィブロインの非結晶部は結晶部より細胞生育を促進することが実施例 1 で分かった。

しかし、実施例 1 で分取した非結晶部分は酵素で切断されたペプチドの混合物と考えられる。

そこで、非結晶部分をさらに分離して、細胞生育促進部位の特定を行った。

まず、実施例 1 の非結晶部分に含まれるペプチドを極性の違いで分けるため、逆相クロマトグラフィーで分離した。

カラムはRESOURCER RPC 3 m l を使用した。

A ポンプに 0.1 %TFA (トリフルオロ酢酸) を、B ポンプに 0.1 %TFA/90 %アセトニトリルを使用し、0 ~ 15 分で B が 0 ~ 75 % になるグラジェントでクロマトグラフィを行った。

【0078】

その結果、6 つのピーク (A-1、…、A-6) が確認できた。

それぞれのピークを回収し、エバポレーターで乾燥し、少量のバッファー (PBS) で溶解した。

A-1 ~ A-6 のそれぞれの濃度が 0.025 % となるように 70 % エタノールで調整し、細胞培養用ポリスチレンのシャーレ (35 mm ϕ 、ファルコン) に 1 ml ずつ入れて風乾した。

対照区用シャーレは 70 % エタノールのみを 1 ml 入れて風乾した。

これらのシャーレを用いて細胞培養を行った。

細胞培養方法は〔実施例 1〕と同じ方法で行った。

非結晶部分のペプチド断片をコートしたシャーレでのヒト皮膚線維芽細胞の生育率を表 2 に示す。

非結晶部分のうち、A-6 の生育が対照区の約 4 倍と非常に優れていた。

【0079】

次に、細胞生育性に最も優れていた A-6 に含まれているペプチドを分子量で

分けるため、Superdex peptide HR 10/30（ゲルろ過クロマトグラフィー）で分離した。

その結果、A-6-1 から A-6-7 までの 7 つのピークが確認できた。

いずれも分子量 2,500 以下である。

7 つのピークの中で、ピークがシャープで明確な 5 つのピーク（A-6-2、A-6-3、A-6-4、A-6-6、A-6-7）のペプチドを回収し、各ペプチドを細胞培養容器にコートし、そこに培地と細胞を接種し、2 日間培養して、細胞生育性を測定した。

細胞生育性の実験は〔実施例 1〕と同じである。

細胞生育率の測定結果を表 3 に示す。

A-6-2 と A-6-6 は対照区と比べて、2 日間培養で生育率が 1.5 倍を示し、細胞生育促進性に優れていた。

【0080】

そこで、A-6-2 と A-6-6 のアミノ酸配列をベックマン株式会社の LF 3000Protein Sequencer で分析した結果、アミノ酸配列は

A-6-2 VITDSDGNE

A-6-6 NINDFDED

となった。

A-6-2 および A-6-6 とともにフィブロインの N 末端側のペプチドであった。

N 末端部はアミノ酸組成から考えて、非結晶部である。

そこで、A-6-2 と A-6-6 のペプチドを合成し、（北海道システムサイエンス株式会社に委託）、前述と同様に合成ペプチドの生理活性を測定したところ、細胞生育促進性のあることを確認した。

また、合成したペプチド A-6-2 と A-6-6 を混合した場合、それぞれを単独で細胞培養した場合より細胞生育促進性に優れていた。

【0081】

【実施例 3】

合成ペプチドの細胞生育率

家蚕フィブロインH鎖および天蚕フィブロインのアミノ酸配列をもとに、それぞれ合計12部位について合成したペプチド（北海道システムサイエンス株式会社に委託）の細胞活性を測定した。

【0082】

(1) ペプチド合成

家蚕フィブロインの結晶部から2ヶ所の部分ペプチド（SfHC-1、SfHC-2）、及び非結晶部から2ヶ所の部分ペプチド（SfHE、SfHA）を取り上げた。

また、天蚕フィブロインは結晶部としてAla（A）の繰り返し部分（AfH0）、および非結晶部の7部分ペプチド（AfH0～AfH7）を取り上げ、それらを合成した。

家蚕のフィブロインH鎖の部分ペプチドは4種類、天蚕のフィブロインの部分ペプチドは8種類（AfH0～AfH7）あり、それぞれのペプチドのアミノ酸配列を以下に示す。

【0083】

家蚕フィブロインH鎖の部分ペプチド（4種類）

SfHC-1	GAGAGSGAGAGSGAGAGYGAGY
SfHC-2	GAGAGSGAASGAGAGAGAGAGT
SfHE	AASSVSSASSRSYDYSRRNVRKN
SfHA	GSSGFGPYVAHGGYSGYEYAWSSSEDFGT

【0084】

天蚕フィブロインの部分ペプチド（8種類）

AfH0	AAAAAAAAAA
AfH1	YGWGDGGYGSDS
AfH2	SGAGSGGYGGYGSDS
AfH3	GSGAGGRGDGGYGSGSS
AfH4	RRAGHDRAAGS
AfH5	DEYVDN
AfH6	VETIVLEEDPYGHEDIYEED
AfH7	DDGFVLDGGYDSE

【0085】

(2) 合成ペプチドのシャーレへのコート

それぞれの合成ペプチドを約 1 mg ずつとり、PBS 200 μ l に溶解した。溶解したペプチド溶液は 70 % エタノールで希釈し、0.025 % 及び 0.0025 % の濃度に調製し、それらを 1 ml ずつシャーレに入れ乾燥した。

SfHC-1、SfHC-2、SfHE は溶けにくかった為、9 M LiSCN 1 ml を追加して溶解した。

溶解液を半透膜に入れ 100 倍量の水で 30 分ごとに外液をかえて透析し、275 nm の吸光度でタンパク量を確認した。

SfHC-2 はチロシン等が無い為、吸光度の測定はできなかったが、SfHC-1、SfHE は溶解前とほぼ同量存在していたので、SfHC-2 も同量あると仮定し、他のペプチドと同様に 70 % エタノールで希釈しシャーレに入れて乾燥した。

また、AfH0 も溶けにくかったが、透析すると分子量が小さいため抜けてしまう可能性があるため、よく攪拌して 70 % エタノールで希釈しシャーレに入れ乾燥した。

【0086】

(3) 培養

細胞は三光純薬から購入した (凍結) ヒト皮膚線維芽細胞 (成人の正常皮膚由来) を使用した。

培地は、クラボウから購入したヒト皮膚線維芽細胞増殖用低血清培地を使用した。

シャーレ 1 枚につき培地 2 ml を入れ、約 8 万の細胞を接種し、3 日間培養した。

その後、アラマブブルー (IWAKI) を 0.1 ml 入れ、37 $^{\circ}$ C、2 時間培養したのち 570 nm、600 nm の吸光度から計算した色素の還元量を生細胞数とした。

これら細胞培養に関する測定方法は実施例 1 と同じである。

結果を表 4、表 5 に示す。

【0087】

家蚕フィブロインでは、フィブロインの結晶部の部分ペプチドSfHC-1、SfHC-2より、非結晶部の部分ペプチドであるSfHE、SfHAの生育率が高く、対照区の2倍以上の値を示し、非結晶部の部分ペプチド、またはその混合物はSDFGPである。

【0088】

天蚕フィブロインの結晶部の部分ペプチドであるAfH0には活性はほとんど無く、濃度の濃い方（0.025%）が生育率が低いため、細胞生育を阻害していると考えられる。

非結晶部の部分ペプチド合成物AfH1～AfH7は細胞生育促進性を示したが生育率に差が現れた。

例えば、AfH3とAfH6はいずれも塩基性アミノ酸を1残基含むが、AfH3は酸性アミノ酸残基が少なく、AfH6は酸性アミノ酸残基が多いため、AfH6の方が高い細胞生育促進性を示した。

特にAfH1、AfH5、AfH6、AfH7は優れた細胞生育促進性を示し、いずれも合成によって得られたSDFGPである。

【0089】

表5で示したように、非結晶部から得た部分ペプチドの細胞生育率は全てが高くSDFGPとなるわけではない。

それは表6で示したように各ペプチドを構成するアミノ酸側鎖の化学構造の違いによる。

【0090】

【発明の効果】

本発明は、分子量が1万以下、好ましくは3,000以下の特定のアミノ酸配列を有するペプチドを、絹タンパクの非結晶部から分離、分収すると共に、それらと類似のペプチドを合成することにより、細胞生育性に優れた新規ペプチドを提供できた。

これらのペプチドを細胞増殖促進剤、創傷治癒促進剤、化粧品等のスキンケア用素材や細胞培養基材などのバイオ素材として有用可能である。

【0091】

【表1】

結晶部分及び非結晶部分をコートしたシャーレでのヒト皮膚線維芽細胞の生育率

	濃 度	生育率(%)	control との有意差の 信頼率 (%)
対 照 区		100 ± 8.6*	
結晶部分(C')	0.025 %	149 ± 5.6	99.9
	0.0025%	174 ± 8.8	99.0
非結晶部分(A')	0.025 %	259 ± 10.3	99.0
	0.0025%	164 ± 5.0	99.0

(*標準偏差)

【0092】

【表2】

非結晶部分のペプチド断片をコートしたシャーレでの
ヒト皮膚繊維芽細胞の生育

	生育率(%)	control との有意差の 信頼率(%)
対 照 区	100 ± 15.0*	
A-1	124 ± 6.0	< 95
A-2	171 ± 3.5	99
A-3	148 ± 4.5	95
A-4	215 ± 12.0	99
A-5	269 ± 13.0	99.9
A-6	389 ± 12.2	99.9

(*標準偏差)

【0093】

【表3】

ペプチド鎖（表2、A-6）から得た5断片をコートしたシャーレでの
ヒト皮膚線維芽細胞の生育率

	生育率(%)	対照区との有意差の 信頼率(%)
対 照 区	100 ± 6.1*	
A-6-2	153 ± 2.7	99.9
A-6-3	139 ± 15.2	98.0
A-6-4	105 ± 12.2	< 95.0
A-6-6	159 ± 6.6	99.0
A-6-7	124 ± 4.3	99.0

(*標準偏差)

【0094】

【表 4】

家蚕フィブロインの部分ペプチドの合成物をコートした
シャーレでのヒト皮膚線維芽細胞の生育

対 照 区	濃 度	生育率(%)	対照区との有意差の 信頼率 (%)
		100 ± 1.5*	
SiHC - 1	0.025%	194 ± 2.3	99.9
	0.0025%	146 ± 6.0	99.9
SiHC - 2	0.025%	136 ± 1.0	99.9
	0.0025%	116 ± 8.9	95
SiHE	0.025%	243 ± 3.9	99.9
	0.0025%	198 ± 12.5	99
SiHA	0.025%	316 ± 5.7	99.9
	0.0025%	321 ± 6.2	99.9

(*標準偏差)

【0095】

【表 5】

天蚕フィブロインの部分ペプチドを合成しコートしたシャーレでの
ヒト皮膚線維芽細胞の生育

	濃 度	生育率(%)	control との有意差の 信頼率 (%)
対 照 区		100 ± 26.5*	
AfH0	0.025%	100 ± 7.4	<50
	0.0025%	152 ± 6.1	95
AfH1	0.025%	396 ± 4.0	99
	0.0025%	179 ± 13.5	98
AfH2	0.025%	196 ± 9.4	99
	0.0025%	118 ± 14.7	60
AfH3	0.025%	194 ± 24.5	98
	0.0025%	111 ± 9.0	<50
AfH4	0.025%	133 ± 8.7	80
	0.0025%	113 ± 4.8	50
AfH5	0.025%	344 ± 7.7	99.9
	0.0025%	192 ± 11.3	99
AfH6	0.025%	264 ± 9.0	99.9
	0.0025%	152 ± 9.0	95
AfH7	0.025%	284 ± 25.1	99.9
	0.0025%	155 ± 5.3	95

(*標準偏差)

【0096】

【表 6】

合成ペプチドを構成する各種アミノ酸の割合と細胞生育率
 (細胞生育率は表 4 と表 5 でペプチド濃度の高い方 (0.025%) の値である)

家蚕及び天蚕 フィブロインの 部分ペプチド	細胞 生育率 (%)	ペプチド の残基数	G + A		塩基性 アミノ酸	
			数	(%)	数	(%)
SfHC-1	194	22	18	82	0	0
SfHC-2	136	22	19	86	0	0
SfHE	243	23	3	13	5	4
SfHA	316	29	9	31	1	13
AfH0	100	10	10	100	0	0
AfH1	396	12	5	50	0	0
AfH2	196	16	9	56	0	0
AfH3	194	17	10	59	1	6
AfH4	133	11	5	46	4	36
AfH5	344	6	0	17	0	0
AfH6	264	20	1	35	1	5
AfH7	284	13	3	46	0	0

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 腫瘍細胞などの異常な細胞によって産生された細胞増殖因子とは異なり、安全性に優れ、比較的低分子量で安定性にも優れ、かつ細胞生育促進性に優れたペプチドを得ることを目的とする。

【解決手段】 絹タンパクを構成する非結晶部のペプチド鎖から選ばれる 1 又は 2 以上のペプチド鎖の部分ペプチド鎖を含有してなり、該部分ペプチド鎖はアミノ酸残基数が少なくとも 4 ～ 3 2 からなる特定のアミノ酸配列を有するペプチド鎖である細胞生育促進性に優れたペプチド組成物。

【効果】 分子量が1万以下、好ましくは 3, 0 0 0 以下の特定のアミノ酸配列を有するペプチドを、絹タンパクの非結晶部から分離、分収すると共に、それらと類似のペプチドを合成することにより、細胞生育性に優れた新規ペプチドを提供できた。これらのペプチドを細胞増殖促進剤、創傷治癒促進剤、化粧品等のスキンケア用素材や細胞培養基材などのバイオ素材として有用可能である。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 5 5 0 4 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 1 1 6 7 6 4 4]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市観音台2丁目1-2

氏 名

独立行政法人農業生物資源研究所

特願 2 0 0 3 - 0 5 5 0 4 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 7 0 9 4 3 5 2]

1. 変更年月日	2 0 0 2 年 7 月 2 9 日
[変更理由]	住所変更
住 所	茨城県筑波郡谷和原村絹の台 3 丁目 3 - 1 - 9 - 3 0 2
氏 名	坪内 紘三